

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 200326087

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

四氨基铝酞菁和四硝基铝酞菁

在生化分析的应用研究

Application of Tetra-substituted Amino Aluminum
Phthalocyanine and Tetra-substituted Nitro Aluminum
Phthalocyanine in Biochemical Analysis

陈贞茂

指导教师姓名: 李东辉 教授

专 业 名 称: 生化与分子生物学

论文提交日期: 2006 年 6 月 30 日

论文答辩时间: 2006 年 9 月 24 日

学位授予日期: 2006 年 月

答辩委员会主席: 许金钩 教授

评 阅 人: 陈彬教授 朱昌青教授

2006 年 9 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。
本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密（ ），在 年解密后适用本授权书。

2、不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：

日期： 年 月 日

导师签名：

日期： 年 月 日

目 录

摘要	7
Abstract	8
关键词	9
第一章 红区荧光检测技术的应用进展	10
第一节 荧光分析法及其在生化分析的应用	10
第二节 红区及近红外荧光检测技术的特点	14
第三节 各种红区及近红外荧光探针的开发与应用	15
第四节 酞菁类化合物的结构、性质、制备和应用	17
1.4.1 酞菁类化合物的结构特点	17
1.4.2 酞菁类化合物的性质	18
1.4.3 酞菁类化合物的分子光谱特性	18
1.4.3.1 电子吸收光谱	18
1.4.3.2 酞菁类化合物的荧光性质	19
1.4.4 酞菁类化合物的制备	19
1.4.5 酞菁类化合物的应用	20
第五节 论文内容设想	21
参考文献	23
第二章 四氨基铝酞菁作为强碱测定的红区荧光探针	25
第一节 引言	25
第二节 实验部分	26
2.2.1 仪器	26
2.2.2 试剂	26
2.2.3 方法	26
第三节 结果与讨论	27

2.3.1 四氨基铝酞菁的分子结构和吸收光谱特性	27
2.3.2 缓冲液—乙醇体系中四氨基铝酞菁的吸收特性	28
2.3.3 四氨基铝酞菁的荧光特性	29
2.3.4 强碱浓度与四氨基铝酞菁荧光强度的关系	30
2.3.5 四氨基铝酞菁浓度对工作曲线线性区间的影响	31
2.3.6 弱碱的干扰	31
2.3.7 标准曲线和样品的测定	31
2.3.8 结论	32
参考文献	33
第三章 四氨基铝酞菁在次氯酸根测定中的应用	34
第一节 引言	34
第二节 实验部分	35
3.2.1 仪器	35
3.2.2 试剂	35
3.2.3 方法	35
第三节 结果与讨论	36
3.3.1 四氨基铝酞菁的光谱特性研究	36
3.3.2 反应条件的优化	37
3.3.3 标准曲线	38
3.3.4 外源离子的干扰	39
3.3.5 漂白水种ClO ⁻ 含量的测定	39
3.3.6 结论	40
参考文献	41
第四章 四硝基铝酞菁作为还原糖测定的红区荧光探针	42
第一节 引言	42
第二节 实验部分	43
4.2.1 仪器	43

4.2.2 试剂	43
4.2.3 方法	43
第三节 结果与讨论	43
4.3.1 原理与光谱性质	43
4.3.2 反应条件的优化	45
4.3.3 葡萄糖浓度与TAAIPc荧光强度的关系	46
4.3.4 离子的干扰	47
4.3.5 样品的测定	48
4.3.6 结论	48
参考文献	49
第五章 四硝基铝酞菁作为抗坏血酸测定的红区荧光探针	50
第一节 引言	50
第二节 实验部分	51
5.2.1 仪器	51
5.2.2 试剂	51
5.2.3 方法	51
第三节 结果与讨论	51
5.3.1 原理与光谱性质	51
5.3.2 反应条件的优化	53
5.3.3 抗坏血酸浓度与TAAIPc荧光强度的关系	53
5.3.4 离子的干扰	55
5.3.5 样品的测定	55
5.3.6 结论	56
参考文献	57
致谢	58

Content

Abstract in Chinese	7
Abstract in English	8
Key words	9

Chapter 1 Developments of fluorescence analysis in red-region..... 10

Section 1 Introduction	10
-------------------------------------	----

Section 2 Characteristics of fluorescence analysis in red-region.....	14
------------------------------------------------------------------------------	----

Section 3 Fluorescence probes emitting at longwavelenth region.....	15
----------------------------------------------------------------------------	----

Section 4 Phthalocyanine compounds	17
-------------------------------------------------	----

1.4.1 Molecular structure	17
---------------------------------	----

1.4.2 Characteristics	18
-----------------------------	----

1.4.3 Molecular spectra	18
-------------------------------	----

1.4.3.1 Absorbance spectra	18
----------------------------------	----

1.4.3.2 Fluorescence spectra	19
------------------------------------	----

1.4.4 Preparation	19
-------------------------	----

1.4.5 Application	20
-------------------------	----

Section 5 The purpose of this thesis.	21
----------------------------------------------------	----

References	23
-------------------------	----

Chapter 2 Determination of strong alkali using TAAIPc as fluorescence reagent

.....	25
-------	----

Section 1 Background	25
-----------------------------------	----

Section 2 Experimental	26
-------------------------------------	----

2.2.1 Apparatus	26
-----------------------	----

2.2.2 Reagents	26
----------------------	----

2.2.3 Method	26
--------------------	----

Section 3 Results and discussion	27
-----------------------------------------------	----

2.3.1 Structure and absorbance spectra characteristic	27
-------------------------------------------------------------	----

2.3.2 Characteristic of absorption spectra in buffer-ethanol solution.	28
2.3.3 Characteristic of fluorescence spectra	29
2.3.4 Relationship between the concentration of strong alkali and the fluorescence intensity	30
2.3.5 Effect of TAAIPc concentration on the linear range of calibration curves	31
2.3.6 Interference of weak alkali	31
2.3.7 Calibration curves and the determination of practical samples	31
2.3.8 Conclusions	32
References	33
 Chapter 3 Determination of hypochlorite using TAAIPc as fluorescence reagent	
.....	34
Section 1 Background	34
Section 2 Experimental	35
3.2.1 Apparatus	35
3.2.2 Reagents	35
3.2.3 Method	35
Section 3 Results and discussion	36
3.3.1 Spectra characteristics	36
3.3.2 Optimization of reaction conditions	37
3.3.3 Calibration curves	38
3.3.4 Interference of foreign substances	39
3.3.5 Determination of hypochlorite in the bleachers	39
3.3.6 Conclusions	40
References	41
 Chapter 4 Determination of glucose using TNAIPc as fluorescence reagent.	
Section 1 Background	42
Section 2 Experimental	43
4.2.1 Apparatus	43

4.2.2 Reagents	43
4.2.3 Method	43
Section 3 Results and discussion	43
4.3.1 Principle and spectra characteristics	43
4.3.2 Optimization of reaction conditions	45
4.3.3 Relationship between the concentration of glucose and the fluorescence intensity	46
4.3.4 Interference of foreign substances	47
4.3.5 Determination of practical samples	48
4.3.6 Conclusions	48
References	49
 Chapter 5 Determination of vitamin C using TNAIPc as fluorescence reagent.	50
Section 1 Background	50
Section 2 Experimental	51
5.2.1 Apparatus	51
5.2.2 Reagents	51
5.2.3 Method	51
Section 3 Results and discussion	51
5.3.1 Principle and spectra characteristics	51
5.3.2 Optimization of reaction conditions	53
5.3.3 Relationship between the concentration of vitamin C and the fluorescence intensity	53
5.3.4 Interference of foreign substances	55
5.3.5 Determination of practical samples	55
5.3.6 Conclusions	56
References	57
Acknowledgement	58

摘 要

红区荧光试剂在分析科学中的开发与应用是现代荧光分析法的一个重要的领域。铝酞菁化合物易于合成，化学性质稳定，荧光量子产率高，长波激发和红区发射，结构可修饰性强，是一类理想的荧光试剂。

第一章介绍了红区荧光检测技术的特点，由于背景干扰大大降低、检测灵敏度高，使其在生物分析化学各个领域的应用得到越来越多的关注。概述了各种长波发射荧光试剂的开发和应用。重点介绍了酞菁类化合物的光谱性质及其作为红区荧光探针在检测生物化学样品的研究进展。

第二章以四氨基铝酞菁作为红区荧光试剂在强碱测定方面有重要发现。在强碱性介质中，四氨基铝酞菁的缔合作用受到削弱，能够发荧光，且其相对荧光强度随体系中强碱含量的增加而呈对数增长关系。据此建立了以四氨基铝酞菁做为红区荧光探针的强碱测定的方法。

第三章发现在强碱性条件下的四氨基铝酞菁可与 ClO^- 发生明显作用而导致体系荧光的猝灭，且荧光猝灭程度和 ClO^- 的浓度成比例关系。据此，建立了以四氨基铝酞菁为红区荧光探针的 ClO^- （有效氯）测定的方法。

第四章与第五章分别利用葡萄糖和抗坏血酸的还原性，将其与四硝基铝酞菁共热发生反应，反应产物为氨基铝酞菁。氨基铝酞菁在强酸性条件下，氨基发生质子化作用而导致荧光增强。据此，分别建立了测定葡萄糖和抗坏血酸含量的荧光光度法。

Abstract

The synthesis and application of fluorescent reagents, which emit at long-wavelength region is an attractive area in recent years. Aluminum phthalocyanine compounds, with excellent fluorescence characteristic and chemically stable, consist of a class of red-region fluorescent probe. The main objective of this thesis is to explore new application of two of aluminum phthalocyanine compounds used as fluorescent probe emitting at long-wavelength region.

In the first chapter, the development of fluorescence probes emit at red and near-infrared region were reviewed, followed by the introduction of phthalocyanine compounds about their molecular structure, characteristic of molecular spectra and the application in the bio-chemical assay.

In the second chapter, a new method based on the fluorescence enhancement of a red-region fluorescent dye, tetra-substituted amino aluminum phthalocyanine (TAAIPc), in strongly alkaline medium, was developed for the detection of two strong alkali (NaOH , KOH). Under optimal conditions, the linear ranges of the calibration curves were 0.050-5.0 mol/L (NaOH) and 0.033-5.0 mol/L (KOH), respectively. This method has been applied to the analyses of practical samples with satisfactory results. The mechanism for this method was also discussed.

In the third chapter, TAAIPc was applied to the determination of hypochlorite. It was found that in strong alkaline medium, TAAIPc could interact with hypochlorite, resulting in obvious fluorescence quenching. The relative fluorescence intensity was proportional to the concentration of hypochlorite. Based on this phenomenon, a selective method for the determination of hypochlorite in the bleaching solution was established.

In the fourth chapter, tetra-substituted nitro aluminum phthalocyanine(TNAIPc), was found to react with glucose, resulting in obvious enhancement in fluorescence under the acidic medium. TAAIPc could be acidized, resulting in fluorescence enhancement. Based on this phenomenon, a novel method for the determination glucose was constructed and applied to the analysis of practical sample.

In the last chapter, vitamin C had the same reaction with glucose, we also established the method of determination of vitamin C.

关 键 词：铝酞菁, 荧光, 红区, 近红外, 碱, 次氯酸, 葡萄糖, 维生素 C

Key Words: aluminum phthalocyanine, fluorescence, red-region, near-infrared, alkali, hypochlorite, glucose, vitamine C

厦门大学博硕士论文摘要库

第一章 红区荧光检测技术的应用进展

第一节 荧光分析法及其在生化分析的应用

分子荧光是物质的分子吸收了一定波长的光（辐射能），分子内电子被激发到较高的能级以后，当电子返回到低能级状态时，重新放出的较长波长的光。不同的物质发射的荧光光谱不同，荧光的强度与物质的浓度有关。荧光分析法就是利用分子的荧光光谱特性定性和定量分析被测物质的检测方法。应用荧光检测的方法可分为三类：1) 直接利用荧光性物质自身发射的荧光，即所谓的“内源荧光”来进行检测；2) 利用非荧光物质或弱荧光物质与荧光试剂共价或非共价结合，生成荧光性物质，再进行检测，这又叫“外源荧光”法或“荧光探针”技术；3) 荧光猝灭法。现如今，荧光分析法已经发展成为一种重要而且有效的光谱分析手段^[1]。

荧光分析法由于灵敏度高、选择性好、荧光特性参数多、线性动态范围宽且方法简便快速而在诸多学科领域的研究工作中发挥着越来越重要的作用。随着激光、计算机和电子学等方面的新技术成果的引入，大大加速了各式各样新型荧光分析仪器的问世和各种荧光分析新方法、新技术的发展，有力的推动了荧光分析法在理论和应用方面的进展，使荧光分析法不断朝着高效、痕量、微观和自动化的方向推进，不断拓展方法的应用范围。

荧光分析法的快速发展，是与该方法的高灵敏度分不开的。荧光分析法具有很高的绝对灵敏度。在有利或一般的测试条件下往往是其他光谱法所不及的。他的最低检出限在质量分数 10^{-6} ~ 10^{-9} 数量级之间，对荧光效率高的物质甚至可达到质量分数为 10^{-11} 数量级。荧光分析法的灵敏度一般可超过常用紫外可见分光光度法二至三个数量级。所以荧光分析法适于对极其微量的无机元素或有机物质进行分析测定，如对致癌物质 3,4-苯并芘的测定，荧光分析法可达质量分数 10^{-9} 数量级，而紫外可见分光光度法只能达到质量分数 10^{-6} 数量级。这是由于荧光分析法是由通过溶液所发射的荧光强度来测定试样溶液中荧光物质的含量，而荧光强度不仅和被测溶液中荧光物质的性质及其浓度有关，而且与激发光的波长和强度以及荧光检测器的灵敏度有关。加大激发光的强度，可以增大所发射的荧光强

度,从而提高分析的灵敏度。不过对于光敏物质,激发光强度的增大应该有所限制,否则会加大荧光物质的光解作用。随着现代电子技术的发展,采用高灵敏度的检测器,微弱光信号检测的灵敏度也大大提高。另外,在荧光分析中引入适当的表面活性剂,也能大幅度提高荧光分析法的灵敏度。因为表面活性剂的加入,不但提高了荧光配合物的吸光能力,同时也提高了它的量子转化能力。因此,荧光分析法在分析测定低含量试样或高纯度物质中微量杂质方面具有较大的优势。

荧光分析法的另一个优点是选择性好。凡是能够产生荧光的物质,首先必须会吸收一定频率的光,然而由于荧光量子产率的差别,能够吸光的物质却不一定都会产生荧光,况且对于某一给定波长的激发光,能够产生荧光的一些物质所发射的荧光的波长也不尽相同,因而只要适当选择激发光的波长和荧光测定的波长,便可以达到选择性测定的目的。近十多年来迅速发展的一些荧光分析新技术,就是致力于改善荧光测定的选择性。这些新技术在思路上的共同点,就是充分利用测定体系中各待测组份在荧光特性方面的某些差异,达到改善选择性的目的。如利用各组份间在激发光谱或发射光谱方面的差异(即利用光谱的选择性)发展起来的同步扫描荧光测定、导数荧光测定和三维荧光光谱技术;利用组份间荧光寿命的差异,建立了时间分辨荧光测定和相分辨荧光测定;利用荧光体在转动扩散速度上的差异而导致恒态偏振荧光的差别,建立了荧光偏振测定。分析检测样品往往是复杂的,荧光分析法的高选择性满足了在多组份混合物体系中选择性测定某一组份或多组份同时测定的要求,具有很大的发展空间。

荧光分析法简便快速,试样量少,通常采用人们熟悉的校准曲线法。采用荧光分析普查子宫颈癌和鼻咽癌,以及半定量测定黄曲霉毒素,均非常简便快速。由于灵敏度高,取微量试样即可达到分析目的。

荧光分析法由于灵敏度高、选择性好和取样量少,在无机和有机痕量和超痕量分析领域内应用都较广。荧光分析法应用于无机物分析已趋成熟,迄今主要是籍与有机试剂生成强荧光配合物,主要应用于非过渡金属元素;或使待测元素与荧光试剂反应发生荧光猝灭效应,由反应体系荧光的增强或减弱来进行无机离子的分析,主要应用于阴离子分析。有机荧光分析的研究近年来十分活跃,利用有机荧光化合物自身的荧光作用:具有大的共轭 π 键和刚性平面结构的有机化合物,在一定波长的激发光照射下能产生强荧光;而某些不发荧光的脂肪族化合物或者产生很弱荧光的复杂有机化合物,可以通过形成荧光衍生物等方法进行荧光

测定。据此, 荧光分析法已经非常有效的用于各类脂肪族化合物、芳香族化合物、维生素、氨基酸、蛋白质、核酸、生物碱、胺类、酶和辅酶以及各种药物、毒物、体液和农药等的测定, 成为各种领域中有有机物痕量和超痕量分析的重要工具。

在生命科学的众多分支领域中, 荧光分析法也因为其可以高灵敏度、高选择性的检测复杂体系或复杂生物分子集群中的特别组分而取得了广泛的应用。在细胞生物学研究中, 荧光分析法可应用于细胞的活力、细胞膜结构、细胞凋亡以及包括如细胞内酶的活性、细胞内 pH、细胞内离子浓度、细胞膜脂质流动性、细胞膜势能等在内的细胞参数的测定; 例如, 钙离子是非常灵敏的细胞信号分子, 其浓度的变化代表着各种特定的细胞功能的启动、加强或抑制。利用钙离子荧光探针标记细胞, 采用一定波长的激发光使样品发出特定波长的荧光, 在溶液浓度较稀、相同且稳定的条件下, 荧光强度与分子的光吸收度成正比, 测量荧光信号, 就可以获得钙离子的变化信息。例如, 通过评价细胞的氧化能力, 可以测量细胞活性。二氢罗丹明 123 在呼吸过程中可被活的中性白细胞氧化成罗丹明 123, 而且还可以使活植物细胞染色。二氢乙锭也是一种还原态荧光体, 它在染色细胞的胞质中呈蓝色荧光。很多活细胞可将二氢乙锭氧化成乙锭, 而乙锭是 DNA 探针, 插入 DNA 后发红色荧光。例如, DPH 通过脂肪酸链与磷脂相连, 其自身或其脂肪酸衍生物就是细胞膜探针。DPH 和它的衍生物在水溶液中的背景荧光很弱, 可以忽略不计, 而且在膜中方向性好(垂直于脂双层表面)。当嵌进脂双层时, 对磷脂定位顺序有敏感的荧光极化反应。根据该性质, 用 DPH 进行大脂质体中磷脂顺序的空间图像分析。

在核酸分子生物学研究中, 荧光分析法可应用于核酸定量测定、核酸杂交测定、聚合酶链式反应产物检测、核酸结构与序列分析、小分子与核酸相互作用研究、蛋白质定量、蛋白质构象研究、药物与蛋白相互作用研究、酶活力测定; Isaac 等人利用荧光共振能量转移技术研究了对基因表达有调节作用的蛋白质分子中 DNA 结合部位 MSX-1 片断的空间结构: 以内源荧光探针色氨酸残基作为能量供体, 外源荧光化合物作为能量受体被分别键合在螺旋 II、螺旋 I 及氮末端的臂上, 计算得相应的供体受体距离, 从而确定了 MSX-1 的构象; 依靠这种方法能够灵敏地记录机构变化, 在失活条件下色氨酸荧光不受标记受体存在的影响, 而当在缓冲溶液中复性后, 色氨酸的荧光便被猝灭, 表明供体受体对在复性时距离变小^[2]。例如, 荧光染料 SYBR Green I 在 PCR 反应需要的最高温度下可保持稳定,

而且不受 Taq 聚合酶的影响。使用 SYBR Green I 染料,通过分析后测定产物的融化温度,可得到更特异性的定量产物。没有碱基错配的双链 DNA 融化温度比非特异性的含有错配碱基的模板高。使用标记有反应性 SYBR 染料的 PNA 探针可获得更高的特异性。使用专门设计进行这种应用的仪器,可进行实时定量 PCR 实验。用 SYBR Green I 染料进行实时定量 PCR,已经用来建立检测遗传学突变的可靠、简单的诊断方法,包括蚊子药物抗性基因的复制、中间缺失、人类疾病基因的染色体易位、碱基取代。

在免疫学研究中,采用免疫荧光技术或荧光免疫分析法,可对抗原或抗体进行定性、定量的观测。例如,庆大霉素的测定。将一定量的抗体加入到一已被标记的和未被标记的庆大霉素的混合物中,由于已标记的庆大霉素与抗体的结合导致荧光量子产率下降,因此标记的庆大霉素与抗体的结合量将与未标记的抗生素量成反比,通过对未分离混合物中已标记庆大霉素猝灭程度的测量,就可计算出庆大霉素的存在量^[3]。例如,甲状腺素的测定。这是基于标记的抗原与特异性抗体反应时荧光信号增强。异硫氰酸荧光素(FITC)与甲状腺素形成偶联物,再与抗体结合时,碘对这种偶联物的荧光猝灭作用受到抑制而导致荧光增强,从而用来测定甲状腺素。可以说,荧光分析法已经成为现代生命科学研究不可或缺的重要工具。

各种新技术的发展,加速了计算机技术、电子学技术及荧光检测技术的结合。这些技术的联用是荧光分析法应用于生命科学的发展趋势。激光扫描共聚焦显微技术、流式细胞仪和荧光定量 PCR 检测系统即是上述技术相结合的产物。利用这些新型的仪器可以对研究对象进行直观、实时、原位、定量的观测。新一代仪器系统的出现为荧光分析法提供了更加广阔的发展空间。但是无论是使用一般的荧光计进行测定,还是使用新一代的荧光仪器进行观测,分析技术和检测技术虽然进步快速,荧光分析法都离不开荧光试剂(荧光染料、荧光探针和荧光标记物)的使用。

对于生物和临床样品,大多数生物分子本身无荧光或荧光较弱,检测灵敏度较低,为使之能得以高灵敏地检出,人们用强荧光的标记试剂或荧光生成试剂与待测物进行标记或衍生,生成具有高荧光强度的共价或非共价结合的物质,使检出限大大降低。目前用于标记或衍生的荧光试剂主要有荧光素类、罗丹明类、邻苯二甲醛类等化合物,它们本身或衍生产物具有很高的荧光量子产率,但最

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库